

## 肝血管走行改変と遺伝子治療による全膵機能再生の試み

藤野 和典<sup>1)</sup>, 小島 秀人<sup>2)</sup>, 松村 一弘<sup>1)</sup>, 樫 美和子<sup>2)</sup>, 寺島 智也<sup>3)</sup>, 小川 暢弘<sup>3)</sup>  
江口 豊<sup>1)</sup>

1) 救急集中治療医学講座

2) 分子遺伝医学講座

3) 内科学講座

## Regeneration of a whole pancreatic function by a bloodstream modification and a specific gene transfer to the liver

Kazunori FUJINO<sup>1)</sup>, Hideto KOJIMA<sup>3)</sup>, Kazuhiro MATSUMURA<sup>1)</sup>, Miwako Katagi<sup>3)</sup>, Tomoya TERASHIMA<sup>2)</sup>, Nobuhiro OGAWA<sup>2)</sup> and Yutaka EGUCHI<sup>1)</sup>

1) Critical and Intensive Care Medicine

2) Department of Molecular Genetics in Medicine

3) Department of Medicine

It has been reported that both pancreatic transplantation and islet cell transplantation are beneficial for patients following an extensive pancreatectomy and for patients who have type 1 diabetes mellitus. However, after transplantation, these patients experience the side effects of immunosuppressants and the rejection response. A new therapy to replace transplantation for pancreatic insufficiency is strongly desired. We are seeking a method to regenerate complete pancreatic function using the liver, because the liver and pancreas have the same embryological origin. In our previous studies, we produced a virus vector with the pdx-1 gene, which is well known to be a master gene for pancreatic differentiation, cloned into the helper-dependent adenovirus, and we then administered it to diabetic mice. Although we found cells that produced both insulin and trypsin in the liver portal area, these mice died of fulminant hepatitis because of the pancreatic exocrine enzyme produced by the regenerated cells. Therefore, we think that changing the mode of administration from the tail vein to the bile duct in retrograde fashion to part of the liver might prevent the onset of hepatic failure. The most important difference between the liver and pancreas is that the liver receives its blood supply from the portal vein. To regenerate a pancreas in the liver, we observed that changes occurred in the liver after ligation of the right portal vein. Surprisingly, cell clusters that produced both insulin and trypsin were observed, but these cells were undifferentiated. These results suggest that modification of blood flow is necessary for the differentiation of the pancreas, and gene therapy is also needed for maturation to pancreatic cells. We are trying to regenerate complete pancreatic function in the liver as a therapy to replace transplantation for pancreatic insufficiency.

### 1. はじめに

膵臓での広範な外科的切除にともなう膵内外分泌不全患者や、毎日のインスリン自己注射が必要な1型

糖尿病患者においては、膵移植ならびに膵島移植による治療の有用性が報告されている[1]。本邦においても、2000年に最初の膵移植が行われた後、脳死移植を中心に増加しており、近年の報告では5年生着率73.3%と

Received January 15, 2013 Accepted: February 20, 2013

Correspondence: 滋賀医科大学救急集中治療医学講座 藤野 和典

〒520-2121 大津市瀬田月輪町 kfujino@belle.shiga-med.ac.jp

欧米と比べて遜色の無い成績を残している[2]。しかし、増え続ける I 型糖尿病患者に対しては、圧倒的にドナー不足の状態が続いていること、免疫抑制剤を使用しつづければならないことが問題点として挙げられる。膵島移植に関しては、2000 年に Edmonton プロトコール[3]が発表された後世界的な広がりを見せ、本邦でも 2004 年に最初の膵島移植が行われたが、5 年インスリン離脱率は 10%しかなく[4]、長期成績不良であった。近年の免疫抑制剤の変更により離脱率は上昇傾向にあるものの、膵移植と同様に免疫抑制剤が必要であることは変わりなく、膵移植、膵島移植のいずれの治療法においても、完全な治療法には至っていないのが現状であり、膵機能不全に対する移植以外の新しい治療法が望まれている。そこで我々は、外科的切除後患者、I 型糖尿病患者の両者に有用である全膵機能再生を試みているが、まだ取りかかったばかりである。今回の報告では、現時点までに達成した結果と、今後の目標につき説明する。

## 2. 膵内分泌細胞の再生

膵臓の再生を考えるに当たり、膵臓以外で膵機能を再生させるための臓器が必要である。そこで我々は、その臓器として肝臓に注目した。肝臓と膵臓は前腸の内胚葉上皮より生じる肝芽、膵芽に由来し、特に腹側膵芽は胆管より発生するとされている。このことから、肝臓と膵臓は発生学的に非常に近い存在であることが示唆され、肝臓は膵臓に分化する能力が備わっているのではと考えた。そして我々は、分化誘導因子である Neuro D ならびに膵島増殖ホルモンである betacellulin の遺伝子を組み込んだ、肝臓に親和性の高いヘルパー依存型アデノウイルス (helper-dependent adenovirus: HDAd) をベクターとして作成し、糖尿病マウスの尾静脈より全身投与を行った。その結果、肝臓内に膵島が再生され、糖尿病マウスの血糖値を正常まで低下させることに成功した[5]。同時に、膵臓再生のマスター遺伝子として知られる分化誘導遺伝子である Pdx-1 を組み込んだ HDAd-Pdx-1 を投与した場合には、インスリン陽性細胞が門脈近傍に出現したものの、その細胞は外分泌酵素であるトリプシンも陽性であった。投与後の血糖値は軽度低下したが、肝逸脱酵素の上昇、ビリルビンの上昇を認め、劇症肝炎に伴う肝不全により、投与後 20 日にて死亡してしまった[5]。

## 3. 全膵機能再生のために

我々はこの一連の研究結果を参考とし、全膵機能を再生させる方法があるのではないかと考えた。まず、

導入すべき遺伝子は、内分泌外分泌ともに再生した Pdx-1 が必要である。しかし、以前の研究に於いては HDAd-Pdx-1 を経静脈的に投与したため、肝全域にわたる遺伝子導入が行われてしまい、肝炎から肝不全に陥ってしまった。この問題の解決策として、HDAd-Pdx-1 の投与範囲を限局することにより、肝不全を予防することが出来るのではないかと考えた。また、投与方法を経静脈的より経胆管的に変更することにより、再生された膵外分泌細胞より分泌される酵素が、胆管を経由して消化管に誘導できるのではないかと考えた。具体的には、マウス肝右葉は比較的他の葉から独立しており (他の葉との融合が殆ど見られない)、右葉のみ HDAd-Pdx-1 投与を行うことが可能である。また、経胆管的に投与するためには、胆嚢にカニューレションした後、経胆嚢管的に右肝管を経由して、遺伝子治療ベクターを肝右葉のみに投与することが可能であると考えている (図 1)。

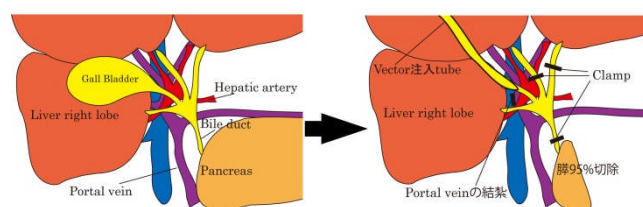


図 1: マウス肝右葉は他の葉との融合が少なくほぼ独立している (図 1 左)。膵 95% 切除を行い、膵内外分泌不全マウスを作製。その後右門脈を結紮し肝動脈よりのみの血流支配とし (肝血流変化)、胆嚢にカニューレションを行い、胆嚢管を経由して右肝管に遺伝子治療ベクターを投与する (遺伝子治療) (図 1 右)。

## 4. 門脈血遮断による肝臓の変化

もう一つの問題点として、再生された膵細胞が肝臓内で長期に存続できるか否かが挙げられる。肝臓と膵臓は発生学的に近い存在であるにもかかわらず、成熟臓器としては全く異なっている。他にも発生学的に近い存在として、腸管が挙げられるが、腸管における迷入膵は存在するが、肝内の迷入膵の存在は皆無と言ってよい。また、膵島移植にて肝臓内に移植された細胞は維持されるのが難しいことが報告されており、(移植後 5 年でインスリン注射不要例は 10% (4)) 肝臓には膵臓への分化を抑制する力が働いている可能性が考えられる。肝臓と膵臓のもっとも大きな違いは、膵臓は門脈の上流に存在する一方、肝臓は門脈の下流に存在することであり、門脈血の供給を受けていることにある。我々は、門脈血に膵臓への分化を抑制する働きがあると仮定し、肝臓への血流が動脈血のみになった

場合、つまり肝臓の一つの葉に供給している門脈を結紮遮断することにより、肝内でどのような変化が生じるかを観察した。すると驚いたことに、門脈結紮を行ったマウスにて、遺伝子治療を行っていないにもかかわらず、肝内に膵内外分泌細胞の細胞塊が出現した(図2)。また、2ヶ月(2M)後にはより鮮明となるが、インスリンとトリプシンが局在せず同一細胞に同様に染色されており、未分化な状態であることが示唆された。門脈血液中には、やはり肝臓を膵臓へと分化させないための何かが存在することが強く示唆され、肝臓にて膵臓を再生させる場合には、門脈結紮が必要と考えられた。

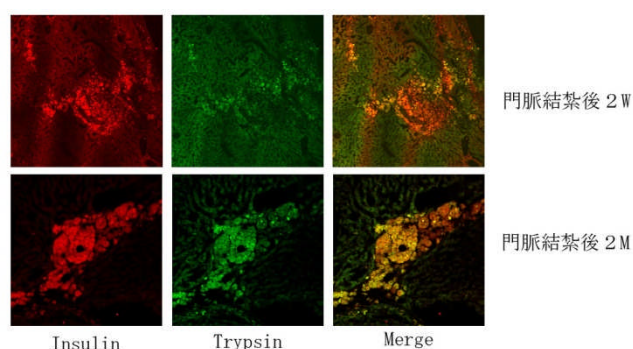


図2：門脈結紮後2週間(2W)にて肝内に出現した細胞塊。抗インスリン抗体、抗トリプシン抗体共に陽性で内外分泌細胞であると考えられる。また、その細胞塊は門脈結紮後2ヶ月(2M)にてより鮮明となったが、インスリンとトリプシンは同一細胞で同様に染色されており、未分化な状態であることが示唆される。

## 5. 今後の展望

以上の結果から、遺伝子治療ベクターの投与法を限局的に、経胆管的に変更することで、肝不全を防ぐことが出来、膵外分泌酵素は消化管へ導かれるようになり、肝血流を改変することにより、再生された膵内外分泌細胞の維持が可能となり、目標とする全膵機能の再生が可能になるのではないかと考えている。今後、マウス膵内外分泌不全モデルマウスを作製し、右門脈結紮による肝右葉の肝血流改変術+右胆管よりの限局的遺伝子治療を行い、全膵機能再生を目指して行きたい。

## 文献

[1] Gruessner A, Sutherland D: Pancreas transplant outcomes for United States(US) and non-US cases as

reported to the United Network for Organ Sharing (UNOS) and the international Pancreas Transplant Registry (IPTR) as of June 2004. Clin Transplant, 19: 433-455, 2005.

[2] 伊藤壽記、石橋道男：本邦における膵臓移植の現況。膵臓, 26:125-131, 2011.

[3] Shapiro AM, Lakey JR, Ryan EA, Korbutt GS, Toth E, Warnock GL, Kneteman NM, Rajotte RV: Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. N Engl J Med, 343: 289-290, 2000

[4] Ryan EA, Paty BW, Senior PA, Alfadhli E, Kneteman NM, Lakey JR, Shapiro AM: Five-year follow up after clinical islet transplantation. Diabetes, 54: 2060-2069, 2005.

[5] Kojima H, Fujimiya M, Matsumura K, Younan P, Imaeda H, Maeda M, Chan L: NeuroD-beta-cellulin gene therapy induces islet neogenesis in the liver and reverses diabetes in mice. Nat Med, 9:596-603, 2003.